

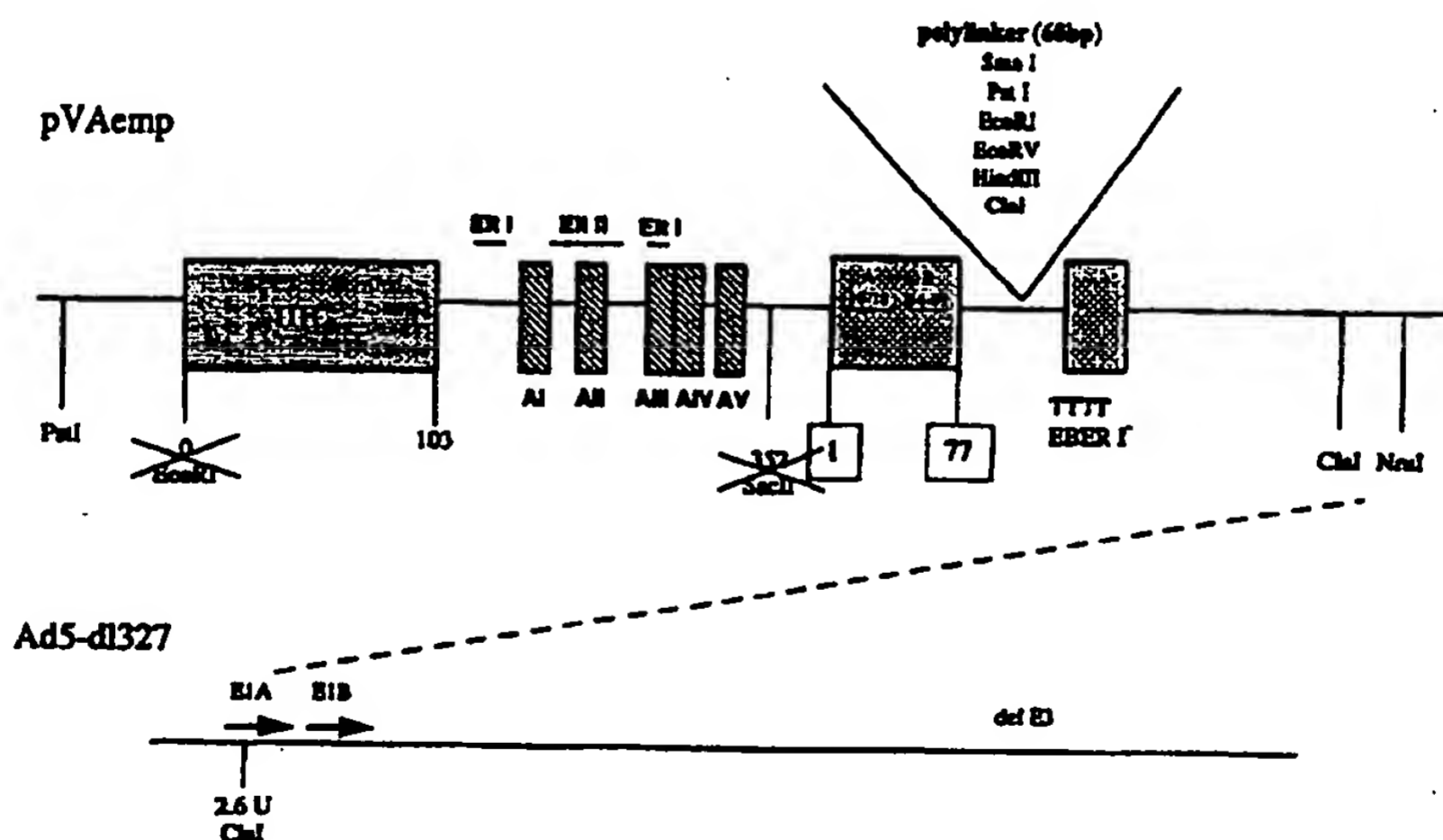


## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/85, 15/86, A61K 31/70</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/27309</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 31 juillet 1997 (31.07.97)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/00103 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 20 janvier 1997 (20.01.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/00718 23 janvier 1996 (23.01.96) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - I.N.R.A. [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> ELOIT, Marc [FR/FR]; 49, avenue Joffre, F-94100 Saint-Maur (FR). ADAM, Micheline [FR/FR]; 54, mail des Pépinières, F-77127 Lieusaint (FR). <b>(74) Mandataires:</b> VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: DNA CONSTRUCTS AND EXPRESSION VECTORS DERIVED FROM THE ADENOVIRUS VA RNA I GENE

(54) Titre: CONSTRUCTIONS D'ADN ET VECTEURS D'EXPRESSION DERIVES DU GENE DE L'ARN VA I D'ADENOVIRUS



## (57) Abstract

DNA constructs including sequences derived from the adenovirus VA RNA I gene, and recombinant vectors including said constructs, are disclosed. Said constructs and vectors are useful for increasing the production of proteins of interest in host cells.

## (57) Abrégé

L'invention est relative à des constructions d'ADN comprenant des séquences dérivées du gène de l'ARN VA I d'adénovirus, ainsi qu'à des vecteurs recombinants comprenant lesdites constructions. Ces constructions et ces vecteurs sont utilisables pour augmenter la production de protéines d'intérêt dans des cellules-hôtes.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

# CONSTRUCTIONS D'ADN ET VECTEURS D'EXPRESSION DERIVES DU GENE DE L'ARN VA I D'ADENOVIRUS.

L'Invention est relative à des constructions d'ADN dérivées du gène VA I d'adénovirus et à leur utilisation pour augmenter le niveau d'expression de gènes d'intérêt.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire ; leur génome, dont la séquence complète est pour certains d'entre eux, connue [cf. par exemple CHROBOEZEK et al. Virology, 186, 280-285 (1992)], comprend à peu près 36000 pb et comporte à ses extrémités des séquences inversées répétées (ITR).

L'infection d'une cellule-hôte par un adénovirus comprend deux phases :

- une phase précoce au cours de laquelle sont exprimées 4 unités de transcription, dénommées E1, E2, E3 et E4, et où sont synthétisés en particulier les facteurs de réplication de l'ADN viral, ainsi que des protéines régulant l'expression de certains gènes viraux et cellulaires ; parmi les gènes transcrits pendant la phase précoce, on mentionnera en particulier les gènes E1 (E1A, et E1B) qui sont situés à l'extrémité gauche (extrémité 5') du génome de l'adénovirus, et qui sont indispensables à la réplication virale ;

- une phase tardive, au cours de laquelle sont exprimés les gènes tardifs L1 à L5 ; les gènes codant pour les protéines de structure du virion sont transcrits sous contrôle du promoteur fort MLP (Major Late Promoter).

Que ce soit au cours de la phase précoce, ou au cours de la phase tardive, la plus grande partie du génome de l'adénovirus est transcrite par l'ARN polymérase II de la cellule-hôte.

Cependant, certains gènes sont transcrits par l'ARN polymérase III : en particulier, deux gènes (VA I et VA II), qui sont situés dans la région L1 (entre les

nucléotides 10160 et 10574 dans le cas de l'adénovirus Ad2), sont transcrits essentiellement pendant la phase tardive de l'infection, pour donner naissance à des ARNs dénommés ARN VA (pour "Virus Associated"), qui s'accumulent dans la cellule en grande quantité. Les séquences promotrices de ces gènes reconnues par l'ARN polymérase III sont intragéniques, et sont dénommées respectivement boîte A et boîte B.

La structure de l'ARN VA I de l'adénovirus Ad2 est représentée à la Figure 1 [d'après la publication de MA et MATHEWS J. Virol., 67, 6605-6617 (1993)]. Cette structure comprend une région terminale (nucléotides 0 à 18 formant un duplex imparfait avec les nucléotides 138 à 160), et une région apicale (nucléotides 42 à 90, formant également une structure en duplex par repliement en épingle à cheveux de la chaîne nucléotidique), qui sont séparées par un domaine central (nucléotides 19 à 41 et 91 à 137).

L'espèce d'ARN VA la plus représentée est l'ARN VA I qui est synthétisé de manière très active pendant la phase tardive, et s'accumule jusqu'à une quantité supérieure à  $10^8$  molécules par cellule. L'ARN VA II est synthétisé en quantité environ 10 fois moindre.

Il a été montré que, dans des cellules infectées par les adénovirus, l'ARN VA I était nécessaire pour accroître la traduction des ARNm pendant la phase tardive de l'infection.

Il a également été observé dans le cadre d'expérimentations d'expression transitoire, que l'ARN VA I pouvait stimuler, même en l'absence d'infection adénovirale, l'expression de gènes rapporteurs introduits dans des cellules.

C'est ainsi qu'en 1985, SVENSSON et AKUSJÄRVI [EMBO J. 4, p. 957-964] ont démontré que l'augmentation d'efficacité d'expression ne se limite pas aux ARNm

5      viraux : ces auteurs ont en particulier procédé à la co-transfection de cellules avec un plasmide porteur du gène CAT, et un plasmide porteur de la région VA I. Ils ont montré dans ces conditions une stimulation significative (6,5x) dans les cellules 293, qui complémentent en trans pour le gène E1A, mais pas dans les cellules HeLa et CV-1 (environ 2x). Selon ces auteurs, ces résultats seraient dus à une mauvaise efficacité de transcription du gène VA I dans ces deux derniers types cellulaires.

10              KAUFMANN [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, p. 689-693, (1985)] a également montré l'augmentation de l'expression d'un gène rapporteur par le gène VA I fourni en cis ou trans. Selon cet auteur, cet effet est surtout marqué pour des gènes rapporteurs placés sous le contrôle  
15 du MLP et de ses trois séquences leader non traduites situées en 5' du gène.

            L'ARN VA I agit essentiellement en bloquant l'activation de la protéine-kinase PKR (également dénommée DAI). [Pour revue, cf. MATHEWS M.B., Enzyme, 44,  
20 p. 250-264, (1990) ; MATHEWS et SHENK, J. Virol., 65, p. 5657-5662, (1991)].

            La PKR, dont la synthèse est induite par l'interféron, est associée au ribosome, dans un complexe réunissant tous les facteurs de la traduction. Cette  
25 protéine-kinase est normalement activée par les ARN double brins (ARN-ds) présents en quantité importante dans la cellule du fait de l'infection virale. Cette activation se traduit par une autophosphorylation de l'enzyme, puis une phosphorylation du facteur  
30 d'initiation de la traduction eIF-2 (Eukaryotic Initiation Factor 2). Le facteur eIF-2 phosphorylé ne peut être recyclé, ce qui conduit à une inhibition de l'initiation de la traduction.

            Lorsque l'ARN VA I est présent en quantité  
35 suffisante dans la cellule, c'est à dire après la transition vers la phase tardive du cycle viral,

l'activation de la PKR ne se produit pas, et les ARNm tardifs viraux peuvent être traduits.

Différents travaux ont permis de décrire le mécanisme d'interaction VA I-PKR et les sites impliqués  
5 [MELLITS et MATHEWS, EMBO J. 7, p. 2849-2859, (1988) ; MELLITS et al., Cell. 61, p. 843-852, (1990) ; MELLITS et al., J. Virol., 66, p. 2360-2377, (1992) ; MA et MATHEWS, 67, p. 6605-6617, (1993) ; PE'ERY et al., J. Virol. 67, p. 3534-3543, (1993)].

10 Dans un premier temps, le VA I se fixe à la PKR par l'intermédiaire de l'extrémité de sa région apicale (nucléotides 54-77 chez l'adénovirus Ad2), et dans un deuxième temps se crée une interaction entre le domaine central du VA I et la PKR, d'où résulte  
15 l'inhibition de l'activation de la PKR.

Il a été montré que des mutations de l'ARN VA I qui altèrent l'extrémité apicale sans détruire sa structure secondaire ne détruisent pas sa fonction, mais qu'en revanche, les mutations qui affectent la  
20 structure du domaine central inactivent sa capacité à inhiber l'activation de la PKR.

Les adénovirus peuvent constituer des vecteurs fonctionnels pour l'expression de gènes d'intérêt dans des cellules animales, par exemple dans des cellules de  
25 mammifères, et également d'oiseaux, ou de poissons. Leur emploi a ainsi été préconisé pour l'obtention de vaccins vivants recombinants, pour la thérapie génique, et également pour la production de protéines hétérologues dans des cultures cellulaires. De très nombreux systèmes  
30 d'expression utilisant les adénovirus ont ainsi été décrits.

Pour obtenir des vecteurs d'expression dérivés d'adénovirus, les séquences d'ADN hétérologue que l'on souhaite exprimer sont insérées à la place de séquences  
35 génomiques de l'adénovirus, ou à l'intérieur de ces séquences : les régions E1 (E1A et E1B), E3, et E4, ont

en particulier été utilisées pour l'insertion de séquences hétérologues.

Lorsque qu'une séquence hétérologue est insérée dans E3, qui n'est pas une région essentielle pour la répllication, les adénovirus peuvent être répliqués dans n'importe quelle lignée cellulaire permissive. Des lignées cellulaires permissives pour les adénovirus sont d'origine humaine ou animale (mammifères, oiseaux, poissons).

En revanche, si une séquence hétérologue est insérée dans la région E1, les adénovirus obtenus sont incapables de répllication dans les cellules-hôte habituelles, où ils restent bloqués en phase précoce ; de tels adénovirus, dits "défectifs", sont dépourvus d'effets pathogènes. De ce fait ils sont particulièrement avantageux pour l'utilisation en thérapie génique et pour l'utilisation vaccinale.

La répllication de ces adénovirus défectifs doit être effectuée sur des cellules fournissant les fonctions manquantes ; à titre d'exemple, on citera les cellules 293 [GRAHAM et al. J. Gen. Virol., Vol. 36, p. 59-72 (1977)] : ces cellules sont issues d'une lignée de rein embryonnaire humain, dans le génome de laquelle est intégrée la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 ; elles complémentent en trans pour la région E1 et permettent la répllication des virus défectifs pour cette région.

Généralement, les adénovirus utilisés comme vecteurs d'expression comprennent au moins : les séquences ITR, localisées à chaque extrémité du génome viral (la séquence ITR gauche de Ad5 comprend par exemple les nucléotides 1 à 103 du génome) une séquence d'encapsidation, (dénommée séquence Psi), située entre l'ITR gauche et la région E1, au même niveau que les signaux activateurs de la transcription du gène E1A (E1I et E1II). Ils comprennent également les gènes essentiels

pour la répllication de l'adénovirus, à moins que ceux-ci ne soient apportés par la lignée cellulaire hôte et/ou par un autre adénovirus utilisé comme auxiliaire.

Ils peuvent comprendre en outre d'autres séquences, dont la nature varie selon l'usage que l'on envisage pour le vecteur, et qui sont des séquences d'adénovirus et/ou des séquences hétérologues.

Ces autres séquences incluent généralement, outre le gène d'intérêt que l'on souhaite exprimer, des signaux de régulation de l'expression dudit gène, et en particulier des promoteurs.

Une grande variété de promoteurs est utilisable pour contrôler l'expression de gènes hétérologues clonés dans un adénovirus. Il peut s'agir de promoteurs cellulaires tissu-spécifiques ou non, inductibles ou non, de promoteurs viraux d'adénovirus ou d'autres virus, de promoteurs synthétiques, etc.

Une grande variété d'adénovirus recombinants, conçus pour des usages divers, ont ainsi été obtenus ; on citera à titre d'illustration les vecteurs décrits dans les Demandes Internationales PCT publiées sous les numéros WO 94/08026 du 14 Avril 1995, au nom de RHONE-POULENC RORER S.A. et al.; WO 95/02697 du 26 Janvier 1995, au nom de RHONE-POULENC RORER S.A. ; WO 95/14101 du 26 Mai 1995, au nom de RHONE-POULENC RORER S.A. et al.; WO 95/16772 du 22 Juin 1995, au nom de CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. US.

Il a également été proposé d'utiliser les promoteurs polIII d'adénovirus, tels que ceux des gènes des ARN VA, pour exprimer des ARN d'intérêt, en particulier des ribozymes et des ARN anti-sens [Demande EP 0647 716 au nom de UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS ; VENTURA et al., Nucl. Acid Res. 21, 14, 3249-3255(1993)]. Dans ce cas, la séquence d'intérêt est insérée de préférence à l'intérieur du domaine central,

ou à la place de celui-ci, afin d'inactiver la fonction inhibitrice de l'activation de la PKR.

Il a également été proposé d'utiliser l'ARN VA I pour stimuler l'expression de gènes d'intérêt, en augmentant la traduction des ARNm. Dans ce cas, le vecteur exprimant le gène d'intérêt est co-transfecté avec un vecteur exprimant l'ARN VA I intact (un vecteur de ce type, dénommé pAdVantage™, est par exemple commercialisé par la société PROMEGA).

Cependant, les propriétés de l'ARN VA I n'avaient jusqu'à présent pas trouvé d'applications dans le cas des vecteurs adénovirus défectifs utilisés pour la thérapie génique ou la vaccination ; en effet, ces vecteurs qui sont bloqués en phase précoce de l'infection, ne peuvent pas bénéficier d'une stimulation qui n'intervient qu'en phase tardive du cycle de réplication.

D'autre part, aucun moyen d'augmenter l'efficacité de l'ARN VA I sur la stimulation de la traduction des ARNm n'avait été proposé auparavant.

Or, les Inventeurs ont maintenant obtenu des variants d'ARN VA I, qui lorsqu'ils sont introduits dans la même cellule qu'un gène hétérologue codant pour une protéine d'intérêt permettent d'augmenter la synthèse de ladite protéine. Ils ont en outre obtenu des constructions d'ADN recombinant permettant d'exprimer à un niveau élevé l'ARN VA I d'adénovirus dès la phase précoce de l'infection virale.

La présente Invention a pour objet l'utilisation d'une construction d'ADN recombinant dérivée du gène d'un ARN VA I, et qui comprend au moins le bloc A et le bloc B d'un promoteur reconnu par la polymérase III, et, sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur, une séquence S<sub>1</sub> dont le produit de transcription peut former une structure identique ou similaire à celle de l'extrémité du duplex apical d'un

ARN VA I d'adénovirus, et une séquence  $S_2$  choisie de manière à ce que les produits de transcription desdites constructions d'ADN recombinant constituent des mutants d'ARNs VA I dans lesquels le domaine central du VA I est  
5 au moins partiellement délété ou substitué par une séquence différente de la séquence de type sauvage, pour stimuler la traduction des ARNm dans une cellule-hôte hébergeant ladite construction.

Des promoteurs reconnus par la polymérase III  
10 sont par exemple le promoteur du gène d'un ARN VA d'adénovirus, le promoteur du gène d'un ARN de transfert, ou bien le promoteur du gène d'un ARN EBER du virus d'Epstein-Barr.

La séquence  $S_1$  peut par exemple comprendre une  
15 séquence dont le transcrit est constitué par les nucléotides 54-72 d'un ARN VA I d'adénovirus Ad2 ; cependant,  $S_1$  peut également comprendre toute autre séquence dont le transcrit peut adopter la même structure secondaire que cette portion d'ARN VA I d'adénovirus, ou  
20 toute structure permettant la fixation de la PKR.

Avantageusement, lesdites constructions d'ADN recombinant comprennent en outre une séquence d'ADN qui constitue un signal de fin de transcription reconnu par l'ARN polymérase III. Des signaux de fin de transcription  
25 reconnus par l'ADN polymérase III, qui peuvent être employés pour l'obtention de ces constructions sont par exemple les signaux de fin de transcription d'ARNs de transfert, ou bien ceux des ARNs VA I ou VA II d'adénovirus, ou le signal de fin de transcription du  
30 gène EBER I du virus d'Epstein-Barr.

Selon un mode de mise en oeuvre de la présente invention, lesdites constructions d'ADN recombinant comprennent, à la place ou à l'intérieur de la séquence du domaine central du VA I, un lieu comprenant au moins  
35 un site de restriction pour le clonage d'une séquence d'ADN hétérologue (par exemple construction VAemp décrite

ci-après) sous contrôle transcriptionnel du promoteur PolIII. Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, il s'agit d'un lieu multisite.

A titre d'exemple, des constructions  
5 utilisables conformément à l'Invention, dénommées VARib et VAie, comprennent respectivement :

- la séquence représentée dans la liste de  
séquence en annexe, sous le numéro SEQ ID NO: 1, qui  
contient la séquence d'un ribozyme de l'ARNm du gène CAT,  
10 et

- la séquence représentée dans la liste de  
séquence en annexe, sous le numéro SEQ ID NO: 2, qui  
contient une séquence anti-sens de l'ARNm du gène IE  
(immediate early) du virus de la maladie d'Aujeszky.

15 Les séquences des constructions VARib et VAie  
correspondantes sont également représentées à la figure  
3.

Lorsque des constructions d'ADN recombinant  
dérivées du gène d'un ARN VA I, telles que définies-ci  
20 dessus sont introduites dans la même cellule qu'un gène  
hétérologue codant pour une protéine d'intérêt, on peut  
obtenir, de manière similaire à ce qui a été observé avec  
les ARN VA I de type sauvage, l'augmentation de la  
synthèse de ladite protéine. Cet effet est inattendu,  
25 dans la mesure où l'intégrité du domaine central du VA I  
était généralement considéré comme indispensable pour  
l'inhibition de l'activation de la PKR.

Les Inventeurs ont constaté que l'augmentation  
de l'expression observée avec des constructions utilisées  
30 conformément à l'Invention pouvait être notablement plus  
importante que celle observée avec le VA I endogène de  
type sauvage. (on désigne par ARN VA "endogène" un  
ARN VA I ou VA II résultant de la transcription d'un gène  
d'ARN VA I ou VA II non-modifié, qui est situé dans son  
35 contexte naturel de transcription, à sa position

habituelle dans le génome d'adénovirus, et qui est flanqué des séquences qui l'entourent naturellement).

En outre, les Inventeurs ont observé une augmentation du niveau d'expression du gène hétérologue aussi bien dans des cas où le domaine central du VA I est substitué par des séquences sans rapport avec le domaine fonctionnel initial (illustré dans les exemples ci-après par les formes VARib et VAie), que dans le cas de la délétion du domaine central du VA I (illustré dans les exemples ci-après par la forme VAemp) sans l'insertion de séquences de remplacement ; dans ce dernier cas, l'effet est toutefois moins intense, et ne se manifeste que dans certaines conditions de co-transfection.

Les Inventeurs ont en outre constaté que, de façon surprenante, l'association d'un élément activateur de la transcription par la polymérase II, avec au moins le bloc A et le bloc B d'un promoteur VA I reconnu par la polymérase III, permet d'exprimer à un niveau élevé les séquences placées sous contrôle du promoteur chimérique ainsi obtenu, et en particulier des gènes de l'ARN VA I sauvage ou des dérivés d'ARN VA I, dès la phase précoce de l'infection virale.

Des constructions dérivées du gène d'un ARN VA I obtenues de la sorte présentent un intérêt tout particulier, car elles sont utilisables pour stimuler la traduction des ARNm, et donc l'expression de gènes hétérologues, par l'intermédiaire d'ARN VA I, modifié ou non, pendant cette phase précoce.

La présente Invention a en conséquence également pour objet des constructions d'ADN recombinant comprenant un promoteur chimérique tel que défini ci-dessus, et en particulier une construction dérivée du gène d'un ARN VA I, et qui comprend au moins :

- un promoteur chimérique reconnu par la polymérase III et constitué par l'association d'au moins une séquence d'ADN qui constitue un élément activateur de

transcription d'un promoteur PolII, et d'une séquence d'ADN comprenant au moins le bloc A et le bloc B d'un promoteur reconnu par la polymérase III ; et, sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur

5                   - au moins une séquence  $S_1$ , telle que définie ci-dessus, dont le produit de transcription peut former une structure identique ou similaire à celle de l'extrémité du duplex apical d'un ARN VA I d'adénovirus (il s'agit en particulier de toute séquence dont le  
10 transcrit peut adopter la même structure que les nucléotides 54-72 du gène d'un ARN VA I) ; et

                  - au moins une séquence d'ADN qui constitue un signal de fin de transcription reconnu par l'ARN polymérase III.

15                   On entend par : "élément activateur de transcription PolII" une séquence qui active habituellement la transcription par la polymérase II. De nombreux éléments activateurs de la transcription PolII sont connus en eux-mêmes ; il peut s'agir par exemple  
20 d'éléments activateurs du gène IE (immediate early) du CMV ou d'autres gènes viraux, ou bien d'éléments activateurs de gènes cellulaires (immunoglobuline, albumine, etc...)

                  Avantageusement, il s'agira d'un élément  
25 activateur de la transcription du gène E1A d'adénovirus.

                  Ces constructions d'ADN peuvent comprendre, en outre, d'autres séquences et en particulier toute séquence choisie de manière à ce que les produits de transcription desdites constructions soient des mutants  
30 d'ARNs VA I dans lesquels le domaine central du VA I est au moins partiellement délété ou substitué par une séquence différente de la séquence sauvage.

                  Par exemple, une construction d'ADN recombinant conforme à l'Invention comprend :

- les nucléotides 0 à 352 de l'adénovirus Ad5 ou une région homologue d'un autre adénovirus humain ou animal;

5 - les nucléotides 1 à 77 du gène VA I de l'adénovirus Ad2 ;

- le signal de fin de transcription du gène EBER I du virus d'Epstein-Barr.

Des constructions conformes à l'Invention peuvent comprendre en particulier l'une des séquences représentées dans la liste de séquences en annexe, sous les numéros SEQ ID NO: 1, et SEQ ID NO: 2.

Pour augmenter l'expression d'un gène d'intérêt dans une cellule-hôte, on introduit et on exprime simultanément dans ladite cellule-hôte une construction d'ADN comprenant ledit gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur approprié, et une construction d'ADN dérivée du gène d'un ARN VA I, telle que décrite ci-dessus.

Pour introduire et exprimer dans une cellule hôte les constructions dérivées du gène d'un ARN VA I décrites ci-dessus, ainsi que le ou les gène(s) d'intérêt dont on souhaite accroître le niveau d'expression, on peut utiliser différents types de vecteurs, tels que des plasmides, par exemple des plasmides d'expression transitoire, des plasmides réplicatifs en position extrachromosomique (lignées cellulaires constitutives), des plasmides capables de s'intégrer aux chromosomes cellulaires, des virus recombinants, en particulier des adénovirus, humains, animaux, ou mixtes.

30 La construction d'ADN comprenant un gène d'intérêt dont on souhaite accroître le niveau d'expression, et la construction d'ADN dérivée du gène d'un ARN VA I, peuvent être portées par le même vecteur, ou bien par deux vecteurs différents.

35 La présente Invention a également pour objet l'utilisation des constructions d'ADN recombinant

dérivées du gène d'un ARN VA I, telles que définies ci-dessus, pour l'obtention de vecteurs permettant d'augmenter l'expression d'au moins une protéine d'intérêt dans une cellule-hôte, ainsi que des vecteurs  
5 recombinaux obtenus de la sorte, et en particulier les vecteurs comprenant une construction d'ADN dérivée du gène d'un ARN VA I, telle que définie ci-dessus, et une construction d'ADN comprenant au moins un gène d'intérêt que l'on souhaite exprimer, placé sous contrôle d'un  
10 promoteur approprié.

La présente Invention englobe également des adénovirus recombinants obtenus par insertion dans un adénovirus d'une séquence d'ADN comprenant au moins le bloc A et le bloc B d'un promoteur reconnu par la  
15 polymérase III, et, sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur, une séquence  $S_1$  telle que définie ci-dessus, dont le produit de transcription forme une structure identique ou similaire à celle de l'extrémité du duplex apical d'un ARN VA I d'adénovirus.

20 Selon un mode de réalisation d'un adénovirus recombinant conforme à la présente Invention, il comprend en outre un gène VA I endogène.

Les adénovirus recombinants conformes à l'Invention peuvent être obtenus à partir de n'importe  
25 quel type d'adénovirus habituellement utilisable pour l'obtention de vecteurs, qu'il s'agisse d'adénovirus humains, animaux, ou mixtes.

Avantageusement il s'agit d'adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, et donc bloqués  
30 en phase précoce du cycle (infection). En effet, si l'on associe, conformément à l'Invention, une séquence d'ADN constituant un élément activateur de la transcription par la polymérase II avec le promoteur PolIII des ARN VA, on peut exprimer en phase précoce de l'infection virale,  
35 toute séquence placée sous contrôle transcriptionnel

dudit promoteur PolIII, et en particulier aussi bien des ARN VA I de type sauvage, que des ARN dérivés de VA I.

Conformément à l'invention, les constructions d'ADN dérivées du gène d'un ARN VA I, les vecteurs, et  
5 les adénovirus recombinants décrits ci-dessus sont utilisables pour augmenter l'expression de protéines d'intérêt dans des cellules-hôtes, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

L'augmentation de l'expression est  
10 indépendante de la séquence du gène d'intérêt et de la nature des séquences de régulation 5' et 3' qui lui sont associées.

Les Inventeurs ont vérifié que cette augmentation de l'expression se manifestait pour  
15 différents gènes hétérologues, variant aussi bien par les promoteurs utilisés, que par les régions codantes, ou les séquences en 5' non traduites de l'ARN messager, et également dans différentes lignées cellulaires (HeLa et Vero).

Conformément à l'Invention, les constructions  
20 ainsi que les vecteurs définis ci-dessus, peuvent être employés en association avec d'autres moyens visant à augmenter ou réguler le niveau d'expression des gènes. Par exemple, ils peuvent être associés avec des gènes  
25 clonés sous contrôle de promoteurs tissu-spécifique, ou de promoteurs inductibles.

Le domaine de la thérapie génique ou  
cellulaire par vecteur adénovirus est un domaine privilégié, mais non unique, d'application de la présente  
30 Invention.

Conformément à l'Invention, les constructions  
ainsi que les vecteurs recombinants définis ci-dessus peuvent également être employés pour augmenter le niveau d'expression de protéines immunogènes dans le cadre de  
35 l'obtention de vaccins, ou bien pour la production *in vitro* de protéines d'intérêt en cellules de mammifères,

ou toute autre cellule permissive pour les adénovirus (cellules d'oiseaux, de poissons, etc.).

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention et d'utilisation de constructions d'ADN dérivées du gène VA I.

#### CELLULES ET VIRUS UTILISES

Les adénovirus ont été multipliés et titrés sur cellules de rein embryonnaire humain 293.

Différentes cellules (cellules simiennes Vero, cellules humaines Hela) ont d'autre part été employées pour mesurer le niveau d'expression de protéines exogènes.

Les cellules Hela sont issues d'une lignée de carcinome épithélial humain ; elles possèdent une activité E1A-like, et sont donc capables, à forte multiplicité d'infection, de compléter en partie pour le gène E1A absent.

Les cellules Vero sont issues d'une lignée de rein de singe ; elles ne permettent pas la réplication des virus défectifs pour la région E1A.

Toutes ces cellules ont été entretenues en milieu de EAGLE modifié DULBECCO, additionné de 10% de sérum de veau foetal et d'antibiotiques.

#### 25 PLASMIDES

Les différents plasmides ont été construits suivant des procédures standard connues de l'homme du métier, telles que celles décrites par SAMBROOK et al. [Molecular cloning : A Laboratory Manual ; Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989].

Le plasmide pMLPluc comprend le gène luciférase précédé des séquences leader des ARNm tardifs de l'adénovirus sous le contrôle du promoteur MLP de l'adénovirus Ad2.

Le plasmide pCMVcat exprime le gène CAT sous le contrôle du promoteur du gène immediate early (IE) du cytomégalovirus.

La construction des plasmides conformes à l'Invention exprimant des séquences dérivées du VA I est décrite plus en détail dans les exemples qui suivent.

#### CONSTRUCTION DES ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Les adénovirus porteurs des différents ARN-VA modifiés ont été construits par ligation entre :

1) des plasmides intégrant l'ITR de gauche, les signaux d'encapsidation et les signaux activateurs du gène E1A de l'adénovirus Ad5 (nt 1-352), ainsi que le gène VA I modifié et

2) la partie droite du génome d'Ad5 digéré par l'enzyme ClaI. Cette partie comporte le gène de type sauvage de l'ARN VA I (également dénommé ci-après VA I endogène).

Les produits de ligation ont été transfectés dans des cellules 293. Les plages de lyse ont été isolées 10 à 15 jours plus tard. Après amplification, le DNA léger a été extrait par la technique de HIRT [GLUZMAN et al., J. Virology, 45, p. 91-103, (1983)] et la conformité de la construction a été vérifiée par analyse de restriction. Par construction, ces adénovirus ont un phénotype E1A-, E1B+.

#### DOSAGES DES ACTIVITES LUCIFERASE ET CAT

Le dosage de l'activité CAT a été réalisé par un test ELISA (BOEHRINGER). Le dosage de l'activité luciférase a été effectué suivant une procédure standard (Kit Luciferase Assay System ; PROMEGA BIOTECH) en utilisant un compteur à scintillation.

EXEMPLE 1 : CONSTRUCTION DU PLASMIDE pVAemp ET DU VIRUS Ad-VAemp.

Le plasmide pVAemp a été construit comme suit :

5 Un plasmide (pMLP-gI) similaire au plasmide pMLP10-gD (ELOIT et al., J. Gen. Virol., 71, 2425-2431, 1990) a été utilisé. Le site EcoRI en position 0 de pMLP-gI a été supprimé par digestion, remplissage des extrémités par le fragment de Klenow de l'ARN polymérase  
10 II, et religation. Les séquences de ce plasmide comprises entre le site SacII (nucléotide 352) et ClaI (nucléotide 2498) ont été délétées. La région 0-352 comprend l'ITR et les signaux d'encapsidation (nucléotides 0-352) du virus de l'Ad5. Ces derniers sont indissociables des signaux  
15 activateurs de la transcription du gène E1A (Elt I et II).

En aval du site SacII ont été clonés :

- la partie 5' du gène VA I (nucléotides 1 à 77), comprenant les deux séquences promotrices  
20 intragéniques A et B,
- un polylinker et
- les signaux de fin de transcription du gène EBER I du virus Epstein-Barr. Ces séquences (222 pb) ont été isolées par clivage NsiI du plasmide VApIEBER  
25 (Origine : T. Ragot, Unité des virus oncogènes, CNRS, Villejuif ; ce plasmide est similaire, en ce qui concerne la région comprenant les séquences EBER I, à celui décrit dans la publication de VENTURA et al., [Nucl. Acid Res. 21, 14, 3249-3255(1993)]).

30 Le plasmide pVAemp est schématisé à la Figure 2.

Légende de la Figure 2 :

- ITR : séquence terminale inversée gauche de l'Ad5
- Elt I, Elt II : signaux activateurs du gène E1A
- 35 AI à AV : signaux d'encapsidation de l'adénovirus type 5

TTTT : signal de fin de transcription du gène EBER I du virus Epstein-Barr

Les chiffres non entourés correspondent à la séquence de l'Ad5. Les chiffres entourés renvoient à la séquence du  
5 VA I (nucléotide 1 : initiation de la transcription).

Le plasmide pVAemp contenu dans la souche DH5 de *E. coli* a été déposé le 16 Janvier 1996, sous le numéro I-1655 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'INSTITUT  
10 PASTEUR, 25 rue du Docteur Roux, à Paris.

Le virus Ad-VAemp a été construit par digestion du plasmide pVAemp par AatII et AccI et ligation avec le fragment droit du génome d'adénovirus Ad-gD (ELOIT et al., J. Gen. Virol., 71, 2425-2431, 1990)  
15 digéré au site ClaI. Le produit de ligation est transfecté dans des cellules 293, et les virus recombinants sont isolés comme décrit ci-dessus, à la partie "Matériels et Méthodes".

EXEMPLE 2 : CONSTRUCTION DU PLASMIDE p-VARib ET DU VIRUS  
20 Ad-VARib

Le plasmide p-VARib a été construit en clonant la séquence d'un ribozyme de l'ARNm du gène CAT (représentée à la figure 3, ainsi que dans la liste de séquence en annexe, sous le numéro SEQ ID NO: 1) au site  
25 EcoRI-HindIII du lieu multi-sites de pVAemp.

Le virus Ad-VARib a été construit par digestion du plasmide p-VARib par NarI-DraI, et ligation du fragment NarI-DraI de 1061 pb avec le fragment droit du génome d'adénovirus Ad5 digéré au site ClaI.

30 Légende de la Figure 3 :

Caractères gras : séquences insérées dans le lieu multi-site de pVAemp

Caractères italiques : séquences ou séquences complémentaires des amorces ayant servi à réaliser la RT-  
35 PCR de détection de l'expression du gène

Boîtes A et B : séquences promotrices intragéniques du VA I

Les séquences des sites de restriction ayant servi pour la construction sont soulignées.

5 La fonctionnalité du vecteur d'expression de l'ARN VARib a été vérifiée par RT-PCR (rétrotranscription suivie d'amplification par PCR) dans les cellules HeLa infectées par Ad-VARib.

10 Un contrôle a été effectué en utilisant comme témoin le virus Ad-gD. Ce dernier virus est défectif pour le gène E1A, et en outre intègre en partie gauche, (à l'emplacement ou sont clonées chez Ad-VARib, les séquences dérivées de VA I), le gène gD du virus de la pseudorage.

15 Les amorces utilisées sont les suivantes (ces amorces sont également indiquées sur la figure 3, et sont respectivement représentées dans la liste de séquences en annexe, sous les numéros SEQ ID NO: 3 pour l'amorce gauche, et SEQ ID NO: 4 pour l'amorce droite) :

20 Gauche : 5' AGCGGGCACTCTTCCGTGGTCTG 3'

Droite : 5' AAAACATGCCGACCACCAGGGGT 3'

Ces amorces permettent l'amplification de la totalité des 198 bases de l'ARN Varib.

25 Un produit d'amplification de 198 pb est en effet observé pour le recombinant Ad-VARib. Au contraire, le virus Ad-gD donne un résultat négatif. Un témoin réalisé en omettant la phase de rétrotranscription s'est également révélé négatif, ce qui permet de vérifier que le signal obtenu pour Ad-VARib ne résulte pas d'une  
30 amplification des séquences de l'ADN viral.

**EXEMPLE 3 : CONSTRUCTION DU PLASMIDE P-VAie ET DU VIRUS Ad-VAie**

35 Le plasmide p-VAie a été construit en clonant une séquence antisens de l'ARNm du gène IE (immediate early) du virus de la maladie d'Aujeszky (représentée figure 3, ainsi que dans la liste de séquence en annexe,

sous le numéro SEQ ID NO: 2) entre les sites SmaI et HindIII du lieu multi-sites de pVAemp.

Le virus Ad-VAie a été construit par digestion du plasmide p-VAie par AatII-AccI et ligation du fragment  
5 AatII-AccI de 1204 pb avec le fragment droit du génome d'adénovirus Ad5 digéré au site ClaI.

**EXEMPLE 4 : AUGMENTATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DE GENES HETEROLOGUES PAR LE VIRUS Ad-VArīb**

Dans une première étude, le niveau  
10 d'expression du gène CAT dans des cellules infectées par Ad-VArīb a été quantifié. Dans la mesure où il était initialement attendu un clivage de l'ARNm de CAT synthétisé après l'infection par le virus Ad-VArīb, la stratégie suivante a été utilisée : une lignée cellulaire  
15 Hela exprimant le gène CAT sous le contrôle d'un promoteur inductible, à savoir le promoteur de la métallothionine murine (mMT) a été construite, et un clone cellulaire résistant à l'hygromycine a été isolé. Des cellules de ce clone ont été trypsinées puis  
20 infectées à une multiplicité d'infection de 100 TCID<sub>50</sub>/cellule, soit par Ad-VArīb, soit par Ad-VAemp utilisé à titre de témoin.

Seize heures après l'infection (T0), la synthèse de CAT a été induite par addition de métaux  
25 lourds (concentration finale : ZnCl<sub>2</sub>, 100 µM, CdCl<sub>2</sub>, 1 µM).

La synthèse de CAT a été suivie au cours du temps et comparée à celle des mêmes cellules en l'absence d'infection virale. La figure 4 présente les résultats obtenus.

30 Il apparaît clairement une augmentation du niveau de synthèse de CAT de 12,5× dans les cellules infectées par Ad-VArīb par rapport aux cellules non infectées. Dans les mêmes conditions, le virus Ad-VAemp, contenant uniquement les 77 premiers nucléotides du VA I  
35 provoque une augmentation de synthèse de 7,5×.

En l'absence d'induction de la synthèse de la CAT par les métaux lourds, les virus Ad-VAríb et Ad-VAemp ont permis respectivement une augmentation de 29x, et de 5x du niveau de synthèse de la CAT.

5 Il est donc apparent que les virus Ad-VAríb et, à moindre titre, Ad-VAemp, sont capables d'augmenter la synthèse de protéines.

10 EXEMPLE 5 : AUGMENTATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DE GENES HETEROLOGUES PAR LA CONSTRUCTION pVAríb EN DEHORS D'UN CONTEXTE VIRAL.

Pour déterminer les séquences nécessaires pour augmenter le niveau d'expression de gènes hétérologues, 2x10<sup>6</sup> cellules HeLa ont été cotransfectées par le plasmide pMLP-luc contenant le gène luciférase sous le  
15 contrôle du promoteur MLP, et les différents plasmides pVAríb, pVAemp, et à titre de contrôle pMLPCAT. 72 heures plus tard, les cellules ont été prélevées et l'activité luciférase a été quantifiée.

20 Les résultats sont présentés dans le Tableau I ci-dessous.

TABLEAU I

Plasmides	Luciférase (pg/10 <sup>6</sup> cellules)
pVAríb + pMLP-luc	5000
pVAemp + pMLP-luc	<60
pMLPCAT + pMLP-luc	1560

Ces résultats montrent une augmentation importante (3,2x) du niveau de synthèse de la luciférase par le plasmide pVAríb, alors que le plasmide pVAemp  
25 induit un effet inhibiteur.

**EXEMPLE 6 : INFLUENCE DU VA I ENDOGENE ET DE SEQUENCES EXOGENES DE VA I SUR L'AUGMENTATION DE LA SYNTHESE DE PROTEINES**

Les Inventeurs ont effectué des essais comparatifs, en utilisant diverses constructions de génotypes différents en co-infection avec un adénovirus (Ad-MLP-luc) défectif pour la région E1A/E1B, et codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur MLP.

Pour cette expérimentation, deux types de cellules ont été utilisées : les cellules 293, qui permettent la répllication des virus défectifs pour la région E1A (et une expression normale des séquences VA I endogènes des différents adénovirus utilisés), et des cellules Vero, ne permettant pas la répllication des virus défectifs pour la région E1A, et dans lesquelles l'expression des séquences VA I endogènes ne se produit qu'à un niveau très faible.

200 à 250000 cellules Vero ou 293 ont été soit infectées par 100 TCID<sub>50</sub> de virus Ad-MLP-luc, soit co-infectées par 100 TCID<sub>50</sub> de virus Ad-MLP-luc et 100 TCID<sub>50</sub> de l'un des virus suivants : Ad-gD, Ad-VAemp, Ad-VAie Ad-VArīb.

Le virus Ad-gD, qui possède des séquences VA I endogènes mais est dépourvu de séquences VA I exogènes (on désigne par ARN VA "exogène" un ARN VA I ou VA II résultant de la transcription d'un gène VA modifié, et/ou situé hors de son contexte naturel de transcription), permet d'évaluer l'effet induit par le VA I exogène.

Les cellules 293 ont été récoltées 24 h après l'infection, soit à un moment où l'effet cytopathique est complet. Les cellules Vero ont été récoltées 4 jours après l'infection.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II ci-dessous.

TABLEAU II

	Ad-MLPluc	Ad-MLPluc + Ad-gD	Ad-MLPluc + Ad-VAemp	Ad-MLPluc + Ad-VAie	Ad-MLPluc + Ad-Varib
VA I endogène	+	+	+	+	+
VA I exogène	-	-	+(emp)	+(ie)	+(rib)
Cellules 293	7560	10160	1260	3400	3600
Cellules Vero	<0.05	1075	2025	2975	10450

Les signes + ou - sur la deuxième et la troisième ligne du tableau indiquent l'existence, dans les cellules transfectées, de VA I endogène ou de VA I exogène.

Les chiffres de la quatrième et de la cinquième ligne indiquent la quantité (en ng) de luciférase synthétisée pour  $10^6$  cellules.

Ces résultats montrent que :

\* Dans les cellules 293, la présence des séquences VA I exogènes portées par les virus Ad-VAemp, Ad-VAie et Ad-Varib n'a pas d'effet positif sur la synthèse de luciférase. Ceci peut s'expliquer par le fait que le VA I endogène qui s'exprime essentiellement en phase tardive de l'infection, suffit à l'augmentation du niveau de traduction des ARNm.

Au contraire, les trois virus Ad-VAemp, Ad-VAie et Ad-Varib semblent avoir un effet négatif sur la production de luciférase (peut-être en raison d'une dérégulation des étapes du cycle viral).

\* Dans les cellules Vero, les séquences VA I exogènes portées par les virus Ad-VAemp, Ad-VAie et Ad-Varib ont un effet positif net sur l'expression de luciférase.

Les constructions Ad-VAemp et AD-VAie permettent un doublement de la synthèse de luciférase (1,9 à 2,8x) par rapport à Ad-gD. La comparaison des

résultats entre le virus témoin Ad-gD et Ad-VArrib montre une augmentation de la synthèse de luciférase d'environ 10 fois en faveur de ce dernier.

Il doit être noté que les résultats illustrant la co-infection Ad-MLP-luc + Ad-gD montrent déjà un effet positif sur la synthèse de luciférase, bien que les deux virus Ad-MLP-luc et Ad-MLP-gD possèdent strictement le même gène VA I, qui ne s'exprime que très faiblement en phase précoce.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet effet :

- La co-infection par les deux virus conduirait à une meilleure efficacité d'internalisation dans la cellule : en effet, l'adénovirus est internalisé par un mécanisme d'endocytose médié par un récepteur (intégrines) qui interagit avec la protéine penton-base. Ce mécanisme est suffisant pour permettre la co-internalisation de molécules (par exemple de l'ADN) délivrées en association avec l'adénovirus. Il est donc possible d'envisager que l'internalisation d'un virion permettrait l'internalisation d'autres virions non liés directement au récepteur cellulaire.

- Alternativement, l'expression du gène E1B (qui est fonctionnel dans les constructions Ad-gD, Ad-VArrib, Ad-VAemp et Ad-Vaie mais délété dans la construction Ad-MLP-luc) pourrait augmenter la transcription en phase précoce du VA I endogène des différents virus impliqués dans les expériences de co-infection [SOLLERBRANT et al., J. Virol., 67, p. 4195-4204, (1993)]. La protéine E1B stabiliserait également l'ADN introduit, avec un effet indirect sur le niveau d'expression mesuré [HERRMANN et MATHEWS, Mol. Cell. Biol., 9, p. 5412-5423, (1989)]. Par contre, la protéine E1B n'ayant pas d'effet activateur connu sur le MLP, il est peu probable que la transcription du gène luciférase

ait été augmentée [HERRMANN et al., Oncogène, 2, p. 25-35 (1987)].

- Enfin, il est possible que l'ARN VA I soit plus efficace lorsqu'il est délivré en trans plutôt qu'en cis.

**EXEMPLE 7 : ETUDE DE L'INFLUENCE DU PROMOTEUR ET DES SEQUENCES LEADER SUR L'AUGMENTATION DE L'EXPRESSION D'UN GENE EN PRESENCE DE SEQUENCES DERIVEES D'ARN VA I**

Les expérimentations relatées dans les exemples 4 à 6 ci-dessus permettent de conclure que l'effet d'augmentation de la synthèse de protéines ne dépend pas de la région codante puisque des résultats comparables ont été obtenus pour la luciférase et la CAT. Il a également été recherché si l'effet d'augmentation de la synthèse de protéines était dépendant du promoteur contrôlant la transcription du gène hétérologue et/ou de la présence des séquences leader non traduites dans les ARNm viraux tardifs.

Le plasmide pCMV-CAT contient le gène CAT sous le contrôle du promoteur du gène "immediate early" (IE) du cytomégalo virus (et donc en l'absence des séquences leader de l'adénovirus).  $2 \times 10^6$  cellules HeLa ont été cotransfectées par le plasmide pCMV-CAT, et l'un des plasmides pVARib, pVAemp, ou à titre de contrôle, pMLP-luc. 72 heures plus tard, les cellules ont été prélevées et l'activité luciférase a été quantifiée.

Les résultats sont présentés dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III

Plasmides	CAT (pg/ $10^6$ cellules)
pCMV-CAT +pVARib	>500
pCMV-CAT +pVAemp	185
pCMV-CAT +pCMV-luc	65

On observe une augmentation importante (supérieure à 7,7x) du niveau de synthèse de la protéine CAT par le plasmide pVARib, alors que le plasmide pVAemp

induit un effet plus limité (2,8x). Ces résultats démontrent que l'effet observé avec le plasmide pVAr<sub>ib</sub> n'est pas dépendant de la présence du promoteur MLP ni de celle des trois séquences leader non traduites des ARNm tardifs de l'adénovirus.

EXEMPLE 8 : UTILISATIONS DES SEQUENCES DERIVEES D'ARN VA I POUR AUGMENTER L'EXPRESSION D'UN GENE IN VIVO CHEZ LA SOURIS

Afin de confirmer les résultats obtenus en culture cellulaire, les expérimentations ont été effectuées chez la souris, en inoculant conjointement un dérivé d'ARN VA I conforme à l'Invention, et un adénovirus recombinant exprimant le gène d'intérêt que l'on souhaitait exprimer.

Dans une première expérience, les souris ont été inoculées par voie intramusculaire, ou intraveineuse, avec l'adénovirus Ad-MLP-luc et, ou bien l'adénovirus Ad-gD (témoin), bien l'adénovirus Ad-VAr. Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau IV ci-dessous.

TABLEAU 4

Virus	Voie d'inoculation	Organe	Nombre de souris	Minimum/maximum	Moyenne	Efficacité
Ad-MLP-luc + Ad-MLP-gD	i.m.	muscle	10	0,2-22,8'	5,1 ± 2,2	1
Ad-MLP-luc + Ad-VAR			9	0,4-25,2	10,0 ± 2,9	1,96
Ad-MLP-luc + Ad-MLP-gD	i.v.	muscle	7	0,1-0,3	0,2 ± 0,02	1
Ad-MLP-luc + Ad-VAR			6	0,1-0,4	0,2 ± 0	1
Ad-MLP-luc + Ad-MLP-gD	i.v.	poumons	7	0,1-0,3	0,2 ± 0,03	1
Ad-MLP-luc + Ad-VAR			6	0,3-17,1	6,7 ± 2,6	33
Ad-MLP-luc + Ad-MLP-gD	i.v.	foie	7	0,03-11,8	2,95 ± 1,6	1
Ad-MLP-luc + Ad-VAR			4	7970-22010	13936 ± 3487	4724

+ ng luciferase/g organe

On voit que Ad-VAr a un effet positif marqué sur la synthèse de luciférase dans le foie ( $\times 4600$ ), et, avec une efficacité plus faible, dans les poumons ( $\times 33$ ), après inoculation conjointe par voie intraveineuse avec  
5 Ad-MLP-luc.

En revanche, l'effet observé est seulement marginal et probablement non significatif dans le muscle après inoculation intramusculaire ( $\times 1,96$ ). Il est supposé que cette différence reflète en grande partie la  
10 probabilité d'infection de la même cellule par un nombre suffisant des deux types de particules adénovirales, dans la mesure où il a été préalablement observé que cette probabilité était maximale dans le foie et à un degré moindre dans les poumons après inoculation intraveineuse  
15 du virus recombinant [OUALIKENE et al., Journal of Virology, 69, p. 6518-6524, (1995)]. On sait d'autre part que la probabilité d'infection des cellules musculaires est relativement faible chez les souris adultes [ACSADI et al., Hum. Mol. Genet. 3, p. 579-584, (1994)]. Il est  
20 supposé que la compétition entre les deux virus pour les récepteurs cellulaires des adénovirus masque un effet positif possible de Ad-VAr.

Dans une deuxième série d'expériences, une approche plus sensible a donc été utilisée pour évaluer  
25 l'efficacité de Ad-VAr quand celui-ci est inoculé par voie intramusculaire. Cette approche est basée sur l'évaluation de la réponse immunitaire contre le produit d'un gène étranger. Dans ce but, le virus Ad-gD, qui comprend le gène PRV gD et qui est capable de protéger  
30 les souris contre une infection par le PRV [ELOIT et ADAM, Journal of General Virology, 75, p. 1583-1589, (1995) ; GONIN et al., Vaccine, 14, p. 1083-1087, (1996)], a été choisi.

Il a été supposé que si le niveau d'expression  
35 du gD pouvait être augmenté par Ad-VAr, la dose de Ad-gD ayant un effet protecteur serait abaissée.

Des expériences préalables effectuées sur la souris avec Ad-gD ont démontré que la dose protégeant 100% des animaux par voie intramusculaire, dans le cas d'une infection standard (20-30 LD<sub>50</sub> par voie intrapéritonéale) était égale à 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub>.

Pour démontrer l'efficacité de Ad-VAr, des doses plus faibles de Ad-gD (respectivement 10<sup>8</sup> et 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>) ont été choisies, et inoculées par voie intramusculaire en même temps que 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub> de Ad-VAr, ou à titre de témoin, 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub> de Ad-MLP-luc. La dose de 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub> a été choisie afin d'obtenir une probabilité maximale de co-infection des cellules par ces virus.

Les résultats sont illustrés par le Tableau V ci-dessous.

15

TABLEAU V

Virus	Dose Ad-gD	Nombre de souris	Survivants (%)	Anticorps anti-gD
Ad-gD + Ad-MLP-luc	10 <sup>7</sup>	5	20	8±150
Ad-gD + Ad-VAr	10 <sup>7</sup>	5	80	78±150
Ad-gD + Ad-MLP-luc	10 <sup>8</sup>	5	80	234±330
Ad-gD + Ad-VAr	10 <sup>8</sup>	5	100	1136±230
Contrôle	0	5	0	ND

Comme attendu, le virus Ad-gD à une dose de 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>, co-inoculé avec Ad-MLP-luc ne protège pas efficacement les souris contre l'infection (20% comparé à 0% chez les souris contrôle). En revanche, la même dose injectée en même temps que Ad-VAr, protège 80% des souris, ce qui est identique au niveau de protection induit par Ad-gD seul à une dose 10 fois plus élevée.

Un effet positif est également observé lorsque Ad-VAr est co-inoculé avec une dose d'Ad-gD de 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>. Bien qu'il apparaisse moins distinctement en ce qui concerne le niveau de protection conféré (100%) par rapport à la co-inoculation Ad-MLP-luc (80%), cet effet est toutefois nettement identifiable par le niveau de la réponse anticorps.

En conclusion, il apparaît que Ad-VAr a permis de diviser par 10 la dose de Ad-gD qui est nécessaire pour obtenir une protection lorsqu'elle est utilisée par voie intramusculaire.

## LISTE DE SEQUENCES

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 194 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGCACTCTTC CGTGGTCTGG TGGATAAATT CGCAAGGGTA TCATGGCGGA CGACCGGGGT 60  
 TCGAACCCCG GATCCCCCGG GCAAAATTCG AGCAACTCTG ATGAGTCCGT GAGGACGAAA 120  
 CTGAAATGGA TCCTCTAGAG TCGACCTGGA GCCCAAGCTT ATCGATTTCG AACCCCTGGT 180  
 GGTCGGCATG TTTT 194

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 217 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGCACTCTTC CGTGGTCTGG TGGATAAATT CGCAAGGGTA TCATGGCGGA CGACCGGGGT 60  
 TCGAACCCCG GATCCCCCGA CTGCAGGCCG CGCGCCGGGA GCCCTGGCTG CCGCCGTCGG 120  
 GGCCGGACGC GATGCCCTCT TCCTCGGCCG GGGCGGCGGC CGCCAGGAGC TGGTTCGAAG 180  
 CTTATCGATT TCGAACCCCT GGTGGTCGGC ATGTTTT 217

## INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page <u>18</u> , ligne s <u>6 à 10</u>	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt CNCM (COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES)	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) INSTITUT PASTEUR 25, rue du Docteur Roux 75015 PARIS FRANCE	
Date du dépôt <u>16 JANVIER 1996</u>	n° d'ordre <u>I-1655</u>
C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex. "n° d'ordre du dépôt")	

<div style="text-align: right;">Réservé à l'office récepteur</div> <div><input checked="" type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale. <u>L. MARDIROSSIAN</u></div> <div>Fonctionnaire autorisé</div>	<div style="text-align: right;">Réservé au Bureau international</div> <div><input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :</div> <div>Fonctionnaire autorisé</div>
---	---

## REVENDICATIONS

1) Utilisation d'une construction d'ADN recombinant dérivée du gène d'un ARN VA I, et qui comprend au moins le bloc A et le bloc B d'un promoteur reconnu par la polymérase III, et, sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur, une séquence S<sub>1</sub> dont le produit de transcription peut former une structure identique ou similaire à celle de l'extrémité du duplex apical d'un ARN VA I d'adénovirus, et une séquence S<sub>2</sub> choisie de manière à ce que les produits de transcription desdites constructions d'ADN recombinant constituent des mutants d'ARNs VA I dans lesquels le domaine central du VA I est au moins partiellement délété ou substitué par une séquence différente de la séquence de type sauvage, pour stimuler la traduction des ARNm dans une cellule-hôte hébergeant ladite construction.

2) Utilisation du bloc A et du bloc B d'un promoteur reconnu par la polymérase III et de séquences S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> telles que définies dans la revendication 1, pour l'obtention d'une construction d'ADN recombinant destinée à stimuler la traduction des ARNm dans une cellule-hôte hébergeant ladite construction.

3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2 caractérisée en ce que ladite construction comprend en outre au moins un site de restriction pour le clonage d'une séquence d'ADN hétérologue sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur PolIII.

4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite construction comprend en outre une séquence d'ADN qui constitue un signal de fin de transcription reconnu par l'ARN polymérase III.

5) Construction d'ADN recombinant caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

- un promoteur chimérique reconnu par la polymérase III et constitué par l'association d'au moins une séquence d'ADN qui constitue un élément activateur de transcription d'un promoteur PolII, et d'une séquence  
5 d'ADN comprenant au moins le bloc A et le bloc B d'un promoteur reconnu par la polymérase III ; et, sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur

- au moins une séquence S<sub>1</sub> telle que définie dans la revendication 1, et

10 - une séquence d'ADN qui constitue un signal de fin de transcription reconnu par l'ARN polymérase III.

6) Construction d'ADN recombinant selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend, en tant qu'élément activateur de transcription PolII, les  
15 signaux activateurs de la transcription du gène E1A d'adénovirus.

7) Construction d'ADN recombinant selon une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence S<sub>2</sub> telle que définie dans la revendication 1  
20

8) Construction d'ADN recombinant selon une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

25 - les nucléotides 0 à 352 de l'adénovirus Ad5  
- les nucléotides 1 à 77 du gène VA I de l'adénovirus Ad2 ;

- le signal de fin de transcription du gène EBER I du virus d'Epstein-Barr.

9) Construction d'ADN recombinant telle que  
30 définie dans une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences représentées dans la liste de séquences en annexe, sous les numéros SEQ ID NO: 1, et SEQ ID NO: 2.

35 10) Utilisation d'une construction d'ADN recombinant telle que définie dans une quelconque des

revendications 1 à 9, pour l'obtention d'un vecteur permettant d'augmenter l'expression d'une protéine d'intérêt dans une cellule-hôte.

11) Vecteur recombinant caractérisé en ce  
5 qu'il comprend une construction d'ADN selon une quelconque des revendications 5 à 9.

12) Adénovirus recombinant caractérisé en ce qu'il est obtenu par insertion dans un adénovirus d'une séquence d'ADN comprenant au moins le bloc A et le bloc B  
10 d'un promoteur reconnu par la polymérase III et une séquence S<sub>1</sub> telle que définie dans la revendication 1, placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

13) Adénovirus recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un  
15 gène VA I endogène.

14) Adénovirus recombinant selon une quelconque des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que ledit adénovirus est défectif pour la région E1A et/ou E1B.

20 15) Utilisation d'une construction d'ADN selon une quelconque des revendications 1 à 9, d'un vecteur recombinant selon la revendication 11, ou d'un adénovirus recombinant selon une quelconque des revendications 12 à 14, pour l'obtention d'un médicament permettant  
25 d'augmenter l'expression d'au moins une protéine d'intérêt dans une cellule-hôte.

16) Utilisation d'une construction d'ADN selon une quelconque des revendications 1 à 9, d'un vecteur recombinant selon la revendication 11, ou d'un adénovirus  
30 recombinant selon une quelconque des revendications 12 à 14, pour l'obtention d'un vaccin.

17) Utilisation d'une construction d'ADN selon une quelconque des revendications 1 à 8, d'un vecteur recombinant selon la revendication 11, ou d'un adénovirus

recombinant selon une quelconque des revendications 12 à 14, pour la production de protéines d'intérêt dans des cultures de cellules.



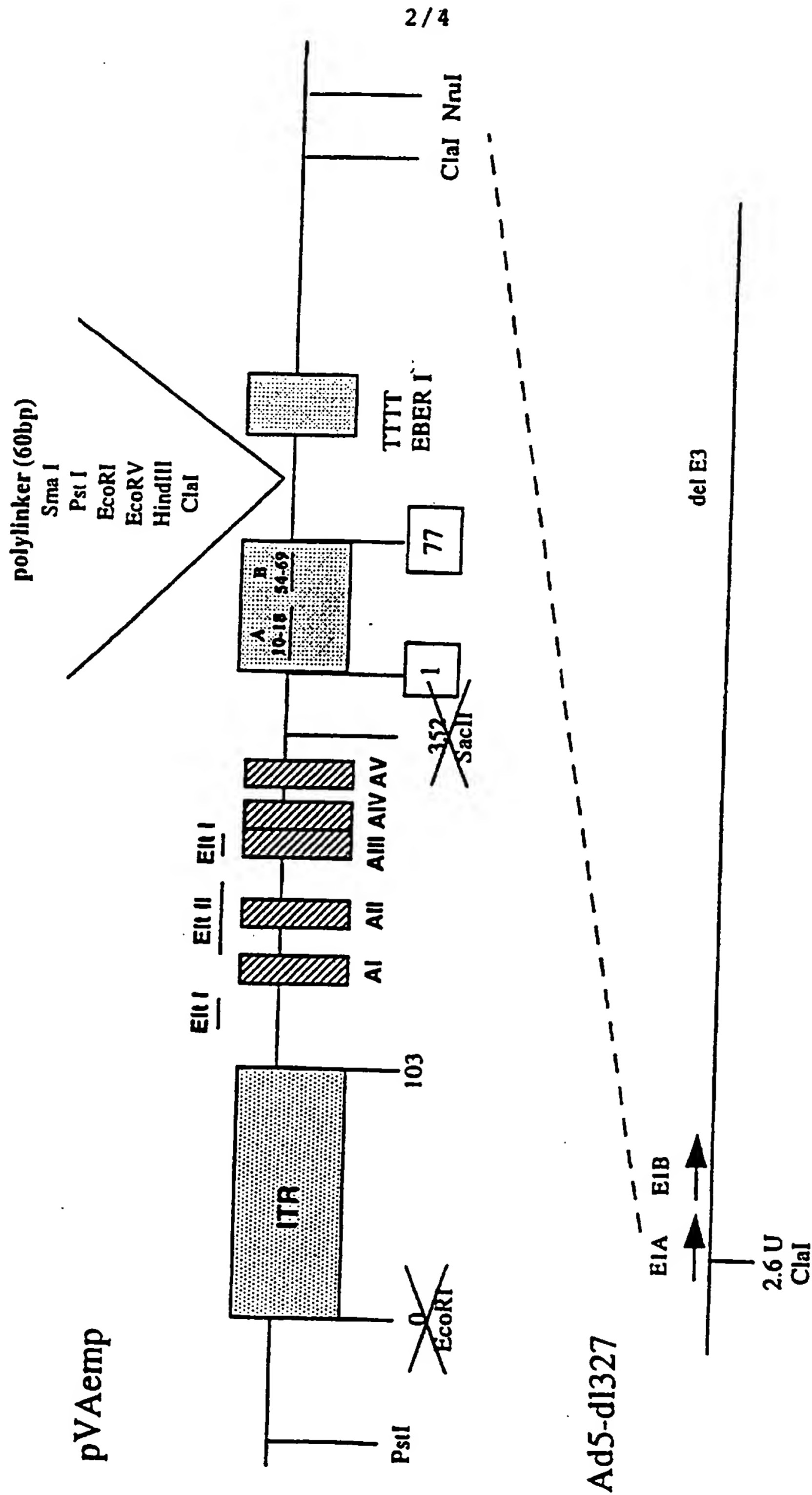


FIGURE 2

**P-VARib**

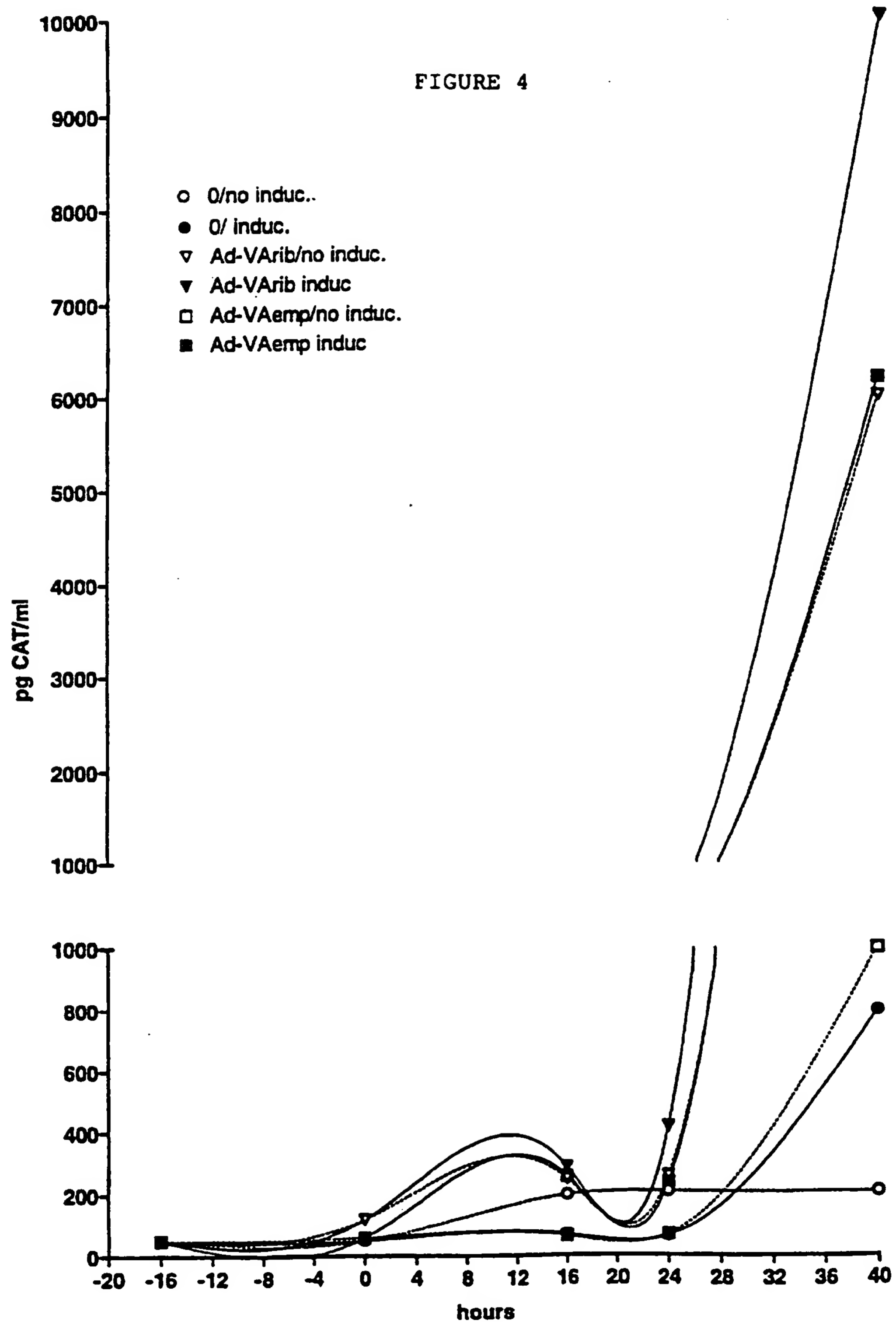
[illegible]

**TATCGATTTCGAACCCCTGGTGGTCGGCATGTTT**

P-Yalc

A box                      B box  
 G C A C T C T T C C G T G G T C T G G T A A A T T C G C A A G G G T A T C A T G G C G G A C G A C C G G G G T T C G A A C C C C ~~CGGATCCCC~~ ~~Signal~~  
  
 PstI  
 G A C T G C A G C C G C C G G G A G C C C T G G C T G C C G C C G T C G G G C C G G A C G C G A T G C C C T C T T C C T C G G C C G G G C G  
  
 HindIII  
 G C G G C C G C C A G G A G C T G G T T C C A A G C T T A T C G A T T T C G A A C C C C T G G T G G T C G G C A T G T T T T

FIGURE 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/FR 97/00103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/85 C12N15/86 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 309 237 A (GENENTECH INC) 29 March 1989 see page 6, line 32 - line 40 see page 18, line 59 - page 20, line 9; claims 15,16; table 7 ---	1-17
A	PROMEGA NOTES, vol. 48, 1994, PROMEGA CORPORATION, MADISON WI, US, pages 8-12, XP002014330 D. GROSKREUTZ AND E. SCHENBORN: "Transient Expression: Increased gene expression in mammalian cell lines using pAdVantage(TM) DNA as Co-transfectant" see the whole document --- -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 April 1997

Date of mailing of the international search report

14. 04. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/FR 97/00103

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EMBO J., vol. 8, no. 9, September 1989, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;; pages 2669-2675, XP002028962 R. STRIJKER ET AL.: "Adenovirus VAI-RNA regulates gene expression by controlling stability of ribosome-bound RNAs" see the whole document ---</p>	1-17
A	<p>EMBO J., vol. 4, no. 4, April 1985, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;; pages 957-964, XP000602843 C. SVENSSON AND G. AKUSJÄRVI: "Adenovirus VA RNAI mediates a translational stimulation which is not restricted to the viral mRNAs" cited in the application see the whole document ---</p>	1-17
A	<p>PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 82, February 1985, NATL. ACAD SCI.,WASHINGTON,DC,US;; pages 689-693, XP002014331 R.J. KAUFMAN: "Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors" cited in the application see the whole document ---</p>	1-17
A	<p>J. GENERAL VIROLOGY, vol. 76, no. 7, July 1995, READING, BERKS, GB, pages 1583-1589, XP002028963 M. ELOIT AND M. ADAM: "Isogenic adenovirus type 5 expressing or not expressing the E1A gene: efficiency as virus vectors in the vaccination of permissive and non-permissive species" see the whole document ---</p>	1-17
A	<p>J. VIROLOGY, vol. 67, no. 6, June 1993, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 3534-3543, XP000602200 T. PE'ERY ET AL.: "Mutational analysis of the central domain of adenovirus virus-associated RNA mandates a revision of the proposed secondary structure" cited in the application see the whole document ---</p>	1-17

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No

PCT/FR 97/00103

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. VIROLOGY, vol. 66, no. 4, April 1992, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 2369-2377, XP000602203 K.H. MELLITS ET AL.: "Role of the apical stem in maintaining the structure and function of adenovirus virus-associated RNA" cited in the application see the whole document ---	1-17
A	EMBO J., vol. 7, no. 9, September 1988, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;, pages 2849-2859, XP002028964 K.H. MELLITS AND M.B. MATHEWS: "Effects of mutations in stem and loop regions on the structure and function of adenovirus VA RNAI" cited in the application see the whole document ---	1-17
A	FR 2 687 411 A (NICE SOPHIA ANTIPOLIS UNIVERSI) 20 August 1993 see the whole document ---	1-17
A	EP 0 647 716 A (UNIV NICE SOPHIA ANTIPOLIS) 12 April 1995 see the whole document ---	1-17
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 14, 11 July 1993, IRL PRESS LIMITED,OXFORD,ENGLAND, pages 3249-3255, XP000567886 M. VENTURA ET AL.: "Activation of HIV-specific ribozyme activity by self-cleavage" cited in the application see the whole document ---	1-17
A	WO 96 01315 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 18 January 1996 see the whole document -----	1-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No  
PCT/FR 97/00103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0309237 A	29-03-89	US 5024939 A	18-06-91
		AT 111156 T	15-09-94
		DE 3851399 D	13-10-94
		DE 3851399 T	20-04-95
		ES 2061671 T	16-12-94
		JP 1165395 A	29-06-89
-----			
FR 2687411 A	20-08-93	NONE	
-----			
EP 0647716 A	12-04-95	NONE	
-----			
WO 9601315 A	18-01-96	DE 4424761 C	08-06-95
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. Internationale No  
PCT/FR 97/00103

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/85 C12N15/86 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 309 237 A (GENENTECH INC) 29 Mars 1989 voir page 6, ligne 32 - ligne 40 voir page 18, ligne 59 - page 20, ligne 9; revendications 15,16; tableau 7 ---	1-17
A	PROMEGA NOTES, vol. 48, 1994, PROMEGA CORPORATION, MADISON WI, US, pages 8-12, XP002014330 D. GROSKREUTZ AND E. SCHENBORN: "Transient Expression: Increased gene expression in mammalian cell lines using pAdVantage(TM) DNA as Co-transfectant" voir le document en entier --- -/-	1-17

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 Avril 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14. 04. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No  
PCT/FR 97/00103

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EMBO J., vol. 8, no. 9, Septembre 1989, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;, pages 2669-2675, XP002028962 R. STRIJKER ET AL.: "Adenovirus VAI-RNA regulates gene expression by controlling stability of ribosome-bound RNAs" voir le document en entier ---</p>	1-17
A	<p>EMBO J., vol. 4, no. 4, Avril 1985, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;, pages 957-964, XP000602843 C. SVENSSON AND G. AKUSJÄRVI: "Adenovirus VA RNAI mediate a translational stimulation which is not restricted to the viral mRNAs" cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1-17
A	<p>PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 82, Février 1985, NATL. ACAD SCI.,WASHINGTON,DC,US;, pages 689-693, XP002014331 R.J. KAUFMAN: "Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors" cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1-17
A	<p>J. GENERAL VIROLOGY, vol. 76, no. 7, Juillet 1995, READING, BERKS, GB, pages 1583-1589, XP002028963 M. ELOIT AND M. ADAM: "Isogenic adenovirus type 5 expressing or not expressing the E1A gene: efficiency as virus vectors in the vaccination of permissive and non-permissive species" voir le document en entier ---</p>	1-17
A	<p>J. VIROLOGY, vol. 67, no. 6, Juin 1993, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 3534-3543, XP000602200 T. PE'ERY ET AL.: "Mutational analysis of the central domain of adenovirus virus-associated RNA mandates a revision of the proposed secondary structure" cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1-17

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	J. VIROLOGY, vol. 66, no. 4, Avril 1992, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 2369-2377, XP000602203 K.H. MELLITS ET AL.: "Role of the apical stem in maintaining the structure and function of adenovirus virus-associated RNA" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-17
A	EMBO J., vol. 7, no. 9, Septembre 1988, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;, pages 2849-2859, XP002028964 K.H. MELLITS AND M.B. MATHEWS: "Effects of mutations in stem and loop regions on the structure and function of adenovirus VA RNAI" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-17
A	FR 2 687 411 A (NICE SOPHIA ANTIPOLIS UNIVERSI) 20 Août 1993 voir le document en entier ---	1-17
A	EP 0 647 716 A (UNIV NICE SOPHIA ANTIPOLIS) 12 Avril 1995 voir le document en entier ---	1-17
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 14, 11 Juillet 1993, IRL PRESS LIMITED,OXFORD,ENGLAND, pages 3249-3255, XP000567886 M. VENTURA ET AL.: "Activation of HIV-specific ribozyme activity by self-cleavage" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-17
A	WO 96 01315 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 18 Janvier 1996 voir le document en entier -----	1-17

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. se Internationale No  
PCT/FR 97/00103

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0309237 A	29-03-89	US 5024939 A AT 111156 T DE 3851399 D DE 3851399 T ES 2061671 T JP 1165395 A	18-06-91 15-09-94 13-10-94 20-04-95 16-12-94 29-06-89
FR 2687411 A	20-08-93	AUCUN	
EP 0647716 A	12-04-95	AUCUN	
WO 9601315 A	18-01-96	DE 4424761 C	08-06-95